

蛍光顕微鏡を用いた大気中アスベスト検出

黒田 章夫・石田 丈典

Detection of Airborne Asbestos by Fluorescent Microscopy

Akio KURODA and Takenori ISHIDA

We discovered asbestos-binding proteins that can specifically bind to chrysotile and amphibole asbestos, respectively. Based on our findings, we developed a fluorescence microscopy-based method for selective and highly sensitive detection of two different types of asbestos. This method relies on fluorescent staining of the asbestos fibers collected on the filter membrane using fluorescence-labeled proteins. The diameter of the thinnest asbestos fibers visualized under fluorescence microscopy was 30–35 nm. Our method could be used for on-site quick monitoring of airborne asbestos, for example during demolition work.

Key words: asbestos, fluorescent microscopy, asbestos-binding protein

アスベストとは、天然に産出する繊維状の鉱物のうち、工業的素材として用いた数種のケイ酸塩鉱物の総称である。大気に浮遊するアスベストは、中皮腫や肺ガンを引き起こすことから、注意深く監視しなければならない。日本においては、2004年にアスベスト使用がほぼ全面禁止になったものの、過去に膨大な量が輸入されたため、アスベストを1%以上含む建材が約4,000万トンも古い建物に取り残されている¹⁾。これらのアスベストを含む建物の解体の際に、アスベストが飛散する可能性が指摘されている。

大気中に浮遊するアスベストの検査では、まず大気を吸引することによって浮遊する物質をフィルター上に捕捉し、そのフィルターを透明化した後に、位相差顕微鏡を用いて繊維状物質を計数し、総繊維濃度を算出する。さらに、総繊維濃度が1本/L以上の場合、繊維が実際にアスベストであるか否かを電子顕微鏡によって判定する²⁾。しかしながら、電子顕微鏡による判定は、前処理等が煩雑であるほか、繊維一本ずつをエネルギー分散型X線解析装置で分析するという非常に時間と根気のいる作業であることから、迅速性が重要な解体現場でのアスベストリスクには対応できない。解体は1週間程度で終わるので、アスベストをまき散らした後に検査結果が出るという場合も少なく

ない。もはや日本のアスベスト発生源は、工場から、解体現場などの短期的に移動する現場へと変わっていることから、解体現場でアスベストが迅速に検出できる方法の開発が急務であるとされている²⁾。

蛍光とは、外部から紫外線や可視光などの励起光を物質に当てたときに、そのエネルギーを吸収することで電子が励起し、それが基底状態に戻る際に余分なエネルギーを光として放出するものである。蛍光顕微鏡は、特にバイオの分野で「蛍光抗体法」(蛍光免疫染色標本の観察)の発明とともに発展してきた。また、近年は緑色蛍光タンパク質(2008年ノーベル化学賞受賞対象)を使って生細胞の中のタンパク質を可視化する際の顕微鏡として、細胞生物学・分子生物学の分野に活躍の場が広がっている。蛍光観察は試料に標識した蛍光色素または蛍光タンパク質そのものの蛍光シグナルを観察する方法で、対象(検出したいもの)の大きさが波長と開口数に依存する分解能よりかなり小さくとも、その存在を検出・可視化できる。現在では高感度CCDにより蛍光一分子の検出も可能になってきており、その対象物を高感度に検出できる。

われわれは、蛍光で修飾したアスベスト結合タンパク質を利用し、蛍光顕微鏡で超微細アスベストを可視化するこ

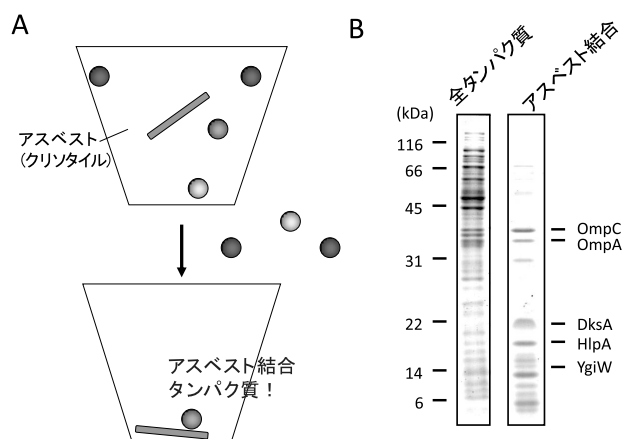


図1 アスベスト結合タンパク質の探索。(A) 細胞内の全タンパク質抽出液にアスベスト(クリソタイル)を投入し、遠心分離にてアスベストを回収する。アスベスト結合タンパク質はアスベストと結合しているため、同時に沈殿する。(B) 大腸菌の全タンパク質(左)とアスベストに結合したタンパク質(右)のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動図。DksAなど複数のタンパク質にアスベスト結合能力がある。

とに成功した。さらには、位相差顕微鏡でアスベストの可能性のある繊維を検出した後、位相差モードから蛍光モードに切り替えて、簡易にアスベストの判定を行う位相差・蛍光顕微鏡法を開発した。これにより、解体現場でアスベストが迅速に検出できると考えられる。

1. アスベスト結合タンパク質

アスベストには、蛇紋石に属するクリソタイル、および角閃石に属するアクチノライト、アモサイト、アンソフィ

ライト、クロシドライト、トレモライトが存在する。これらは細胞よりも大きな無機物なので、通常抗体の取得は難しい。そこで、アスベストに結合するタンパク質を何らかの方法で取得できないかと考えた。アスベストは病気を引き起こす物質なので、細胞の中のタンパク質とアスベストに相互作用があると考えられた。マウスの肺細胞をすりつぶし、そこに含まれるタンパク質とクリソタイルを混合し、クリソタイルを遠心によって沈殿させた(図1)。界面活性剤や塩を含む緩衝液で洗浄後、なおもクリソタイルに結合しているタンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)と質量分析により同定した。アクチンを含め、いくつかのタンパク質がクリソタイルに結合することがわかった。同時に、細菌の細胞内タンパク質にもクリソタイルと強く結合するもの(DksA)があることがわかった³⁾。無機繊維と有機繊維を使って結合の基質特異性を調べた結果、ほぼクリソタイルに特異的であることがわかった(表1)。

一方、角閃石アスベストに結合するタンパク質もすぐに見つかったが、どれも特異性が十分でないことが明らかとなった。例えば、角閃石アスベストに結合するGatz⁴⁾、HNSタンパク質は、ケイ酸アルミ繊維、酸化チタン繊維、ワラストナイト(ケイ酸カルシウム繊維)、炭化ケイ素繊維などの無機繊維と結合してしまう。そこで、HNSの結合特異性を向上させるために、アスベストの結合に関与する領域を限定し、その他の領域を取り除くことで非特異結合を減少させることができるのではないかと考えた。HNS

表1 アスベスト結合タンパク質の基質特異性。

	繊維の種類	DksA	HNS ₆₀₋₉₀
アスベスト繊維	クリソタイル	+	—
	クロシドライト	—	+
	アモサイト	—	+
	アンソフィライト	—	+
	トレモライト	—	+
	アクチノライト	—	+
アスベスト以外の繊維	ガラスウール	—	—
	微細ガラス繊維	—	—
	ロックウール	—	—
	耐火性繊維(RF1:セラミック, 非晶質)	—	—
	耐火性繊維(RF2:セラミック, 非晶質)	—	—
	ケイ酸アルミ繊維(RF3:セラミック, 結晶質)	—	—
	チタン酸カリウムウィスカー	—	+/-
	炭化ケイ素ウィスカー	+	+
	酸化チタンウィスカー	—	—
	ワラストナイト	—	—

HNS₆₀₋₉₀とは、HNSタンパク質のアミノ酸配列60-90に限定したタンパク質を示す。

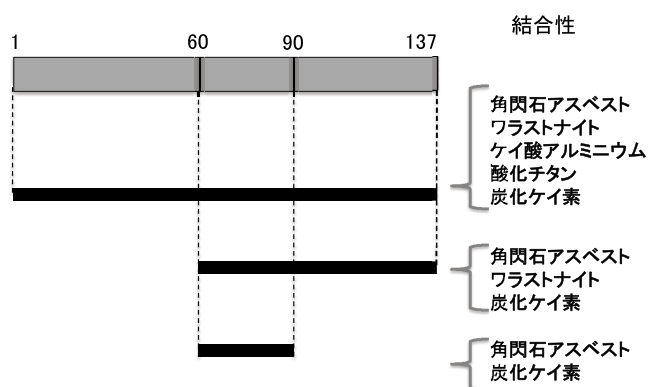


図2 角閃石アスベスト結合タンパク質 (HNS) のアスベスト結合に関与するドメイン。HNSは、137個のアミノ酸からなるタンパク質である。アミノ酸配列 (60-137) に限定することによって、結合するものが少なくなる。さらにアミノ酸配列 (60-90) では、アスベストと炭化ケイ素繊維にのみ結合するので、アスベスト結合ドメインは60-90に存在すると考えられる。

は137アミノ酸からなるタンパク質である。HNSをN末端ドメイン (1～57番目のアミノ酸領域) とC末端ドメイン (60～137番目のアミノ酸領域) の2つの領域に分割したタンパク質を作製し、結合性を調べた (図2)。角閃石系アスベストに対して、N末端ドメインは結合が全く認められなかったが、C末端ドメインは結合が認められたことから、C末端ドメインが角閃石系アスベストの結合に重要であることがわかった。さらに、60～90番目のアミノ酸領域に結合領域を限定することで、特異性の高いバイオプローブを作り出すことに成功した (表1)。

2. 蛍光顕微鏡によるアスベスト検出

アスベスト結合タンパク質を蛍光修飾してバイオプローブを作製し、フィルター上のアスベストを蛍光顕微鏡でとらえる方法を開発した (蛍光顕微鏡法)^{3,4)}。前処理は、大気を捕集したフィルターに数滴の蛍光バイオプローブを垂らした後、緩衝液を同様に数滴垂らして余分な蛍光プローブを流す数分の作業で完成する (図3)。このフィルターをスライドガラスに移して、蛍光顕微鏡で観察する。その結果、位相差顕微鏡では非常に見にくい繊維も蛍光で観察できた。

そこで、どの程度微細なアスベストが観察できているかを調べるために、蛍光法で観察できたクリソタイル繊維の太さを電子顕微鏡で分析することにした。しかし、実際に蛍光顕微鏡で観察した視野と同じ場所を、電子顕微鏡を使って探すことは手間のかかる作業である。そこで、この作業を簡単にするために、光・電子相関顕微鏡システムを用いた。このシステムでは、蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡で同じ試料ステージを用いる。試料ステージに蛍光染色したフィルターを載せ、まず蛍光顕微鏡で観察を行い、観察した視野の位置情報を記録する。次に試料ステージを電子顕微鏡に移し、記録した位置情報を入力すると、自動でその位置まで移動し、同視野を電子顕微鏡で観察できる⁵⁾。光・電子相関顕微鏡システムを用いて、クリソタイルを蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察した (図4)。同一繊維を蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で比較した結果、蛍光顕微鏡で観察できる微細クリソタイルの直径は、30～35 nmであることがわかった (図4)⁶⁾。蛍光顕微鏡も光学顕微鏡であるので、

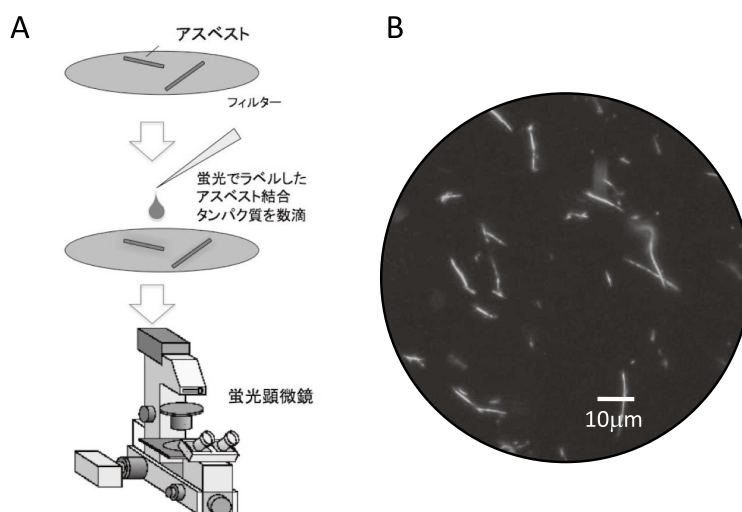


図3 蛍光顕微鏡法による大気中アスベスト検出。(A) 大気を通してアスベストを捕集したフィルターに、蛍光で修飾したアスベスト結合タンパク質を滴下し、蛍光顕微鏡で観察する (数分の作業)。(B) アスベスト (クリソタイル) の蛍光画像。

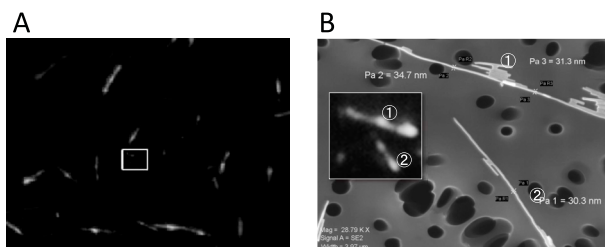


図4 クリソタイルの蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡の比較。(A) 蛍光顕微鏡像 (500 倍)。(B) 蛍光画像 A の白枠部分に対応する電子顕微鏡像 (28,800 倍)。白枠の部分の蛍光画像 (拡大) も内側に示す。①の繊維の幅は 31.3~34.7 nm。②の繊維の幅は 30.3 nm であった。

当然、光学的な解像度の限界 (200~250 nm) が存在する。したがって、実際には 30~35 nm の直径のクリソタイル繊維の正確な幅が検出できていないわけではない (太く観察される)。しかし、暗視野の中で光っているために、分解能よりもかなり小さい対象物でもその存在が検出できるという、蛍光顕微鏡の長所が発揮されている。

蛍光顕微鏡法は、蛍光で見えている繊維がほぼアスベストであるため、電子顕微鏡による判定をする必要がなく、繊維を数えるだけでいいという迅速性にすぐれた方法といえる。また、蛍光顕微鏡法は単繊維のクリソタイルが検出できるので、微細アスベストも見逃すことがない。この方法は、平成 22 年 6 月、環境省アスベストモニタリングマニュアル第 4 版に掲載された²⁾。

3. 位相差・蛍光顕微鏡法の開発

通常、新しい方法は、従来からの基準となる方法とどのような相関があるのか、どう連続性を担保するかということが常に問題となる。位相差顕微鏡を用いたアスベスト検出法による数値が、長い間疫学的危険度の相関に使われてきたことから⁷⁾、今も基本的に位相差顕微鏡による数値が使われている。蛍光顕微鏡法は、位相差顕微鏡では検出できない微細なアスベスト繊維も検出できることから、蛍光顕微鏡法によって検出されるアスベストの総数は、位相差顕微鏡によって検出される総数よりも多くなるおそれがあった。位相差顕微鏡の計測者の中には、「従来の位相差顕微鏡・電子顕微鏡法によって取得された過去のデータと連続性がないのではないか」、「アスベストの測定基準が変わるのではないか」といった懸念が存在した。蛍光顕微鏡法を広く一般化するためには、いかに従来の位相差顕微鏡による計測、電子顕微鏡法による判定の基準を変えないようにアスベストを計測するかという技術的課題を乗り越える必要があった。

位相差顕微鏡に蛍光ユニットを追加して、同一視野を位

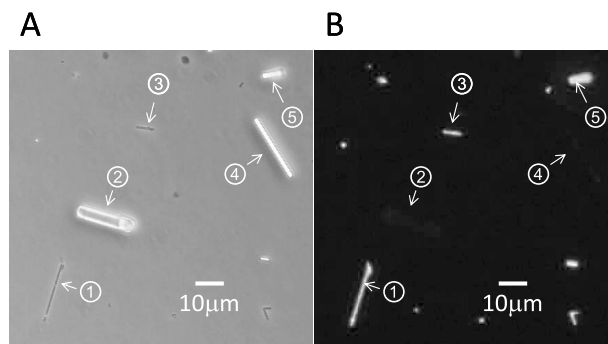


図5 位相差・蛍光顕微鏡法によるアスベスト計測。(A) は位相差顕微鏡画像。(B) は (A) の位相差顕微鏡画像と同一視野における蛍光顕微鏡画像を示す。位相差顕微鏡下で観察した繊維状の物質①、③、⑤において、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合を確認することができた。一方、位相差顕微鏡下で観察した繊維状の物質②および④においては、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合を確認することができなかった。この結果、繊維状の物質①、③、⑤はアスベストであると判定し、繊維状の物質②および④はアスベスト以外の繊維と判定できる。

相差モード (透過型) と蛍光モード (落射型) で切り替えながら観察することが可能である。このモードの切り替えは光源と光路の切り替えだけなので、顕微鏡によってはレバー 1 つで簡単に切り替わる。位相差モードで繊維が確認できれば、蛍光モードに切り替えて、その繊維がアスベストかどうかを判定する。この方法では、まず位相差顕微鏡で計測するので、位相差顕微鏡による総繊維数の数値を超えることはない。しかし、位相差顕微鏡で観察する際にアセトンでフィルターの透明化処理を行うが、その際蛍光タンパク質が見えなくなるという問題があった。そこで、バイオプローブの蛍光の種類と強度を工夫し、透明化処理の際に消えないようにした。その結果、位相差モードで確認した繊維を、蛍光モードに切り替えることによって、アスベストか非アスベストかを判定する位相差・蛍光顕微鏡法が確立できた (図5)。位相差顕微鏡で確認できた繊維のうち、蛍光をもつ繊維をアスベストとして計測できるので、従来の位相差顕微鏡による計測、電子顕微鏡法による判定の計測コンセプトを変えるものではない。すなわち、判定が電子顕微鏡による X 線分析 (原子組成による) か、タンパク質による結合選択性を利用する (表面の原子組成や分子状態による) かの違いだけなので、迅速法としては十分であると考えられる。これにより、位相差顕微鏡の過去のデータとの連続性が担保され、基準が変わるのではないかといった危惧が払拭できた。さらに、電子顕微鏡では、位相差顕微鏡で見た繊維と同一の繊維を観察する (探す) ことは非常に困難であるが、位相差・蛍光顕微鏡法では同一の繊維を確認できることも、記すべき改良点である。

4. 今後の課題

蛍光顕微鏡法では、蛍光の存在の有無で、迅速にアスベストと判定できる。しかしながら、例外的に炭化ケイ素ウイスキーなどが結合するため、現状では100%の判定とはなっていない。今後、さらにバイオブローブの特異性を上げることができれば、公定法として電子顕微鏡による判定と置き換えることができるのではないかと考えられる。そのためにも、実際の現場のサンプルにおいて、結合する物質がほかにないかどうかを今後調べていく必要がある。

アスベストの毒性は長さや太さに依存するため、アスベストモニタリングマニュアルでは長さ $5\mu\text{m}$ 以上、幅(直径) $3\mu\text{m}$ 未満で、かつ長さとの比(アスペクト比)が3以上の繊維を数えることとなっている。接眼レンズにはめ込んだアイピースグレイティクルの目盛を利用して、人の目によって判定している。人の目による判定では、アスペクト比を計測しながら検出するのは大変な労力を必要とするだけでなく、計測者による差が生じている。位相差顕微鏡による観察では、背景と試料との境界部分にはハロとよばれるオーラ状の光が発生し、繊維のコントラストが上がる効果はあるものの、バックグラウンドが局所的にかなり異なってくるため、画像解析による繊維の同定が難しい。一方、蛍光顕微鏡ではハロが発生せず、比較的均一なバックグラウンド補正で検出が可能になると考えられた。株式会社インテックと共同で開発中のソフトは、画像中の部位に応じて繊維輝度の補正を行う適応型コントラスト調整機能を搭載し、長さ $5\mu\text{m}$ 以上、アスペクト比3以上の繊維を数秒で自動検出する。これを利用すれば、アイピースグレイティクルを利用した目視による判定に慣れていない人でも、解現場でのリアルタイムなアスベスト計測ができると考えている。今後は、蛍光画像の解析結果をもとに位相差顕微鏡による観察測定を支援できるような機能を開発することも考えられる。

最近、迅速法として、位相差顕微鏡での計測と偏光顕微鏡での判定を組み合わせた方法が提案されている。偏光顕微鏡はステージを回転させて、消光する角度によってアス

ベストを判定する方法である。ステージを回転させるため、複数の繊維がある場合には位置関係を把握することが困難となる。また、観察画像を撮影する際には、そのままでは回転中に繊維が視野から外れることがあるため、繊維を視野の中心に移動させるといった手間がかかる。蛍光顕微鏡法は視野を回転・移動させることなく判定できるので、その分簡易で時間が短縮される。さらに、ソフトウェアを搭載したものでは、アスベスト計測に慣れていない人でも楽に計測できるので、特にアスベスト飛散可能性がある現場での計測に利用していただきたいと考えている。

東洋大学の神山宣彦教授にはさまざまなアドバイスをいただきながら蛍光法を開発した。現在、結合タンパク質の分子デザインに関しては、環境省の環境研究総合推進費(C-1101)により実施している。また、アスベストの自動計測ソフトウェアは、科学技術振興機構の研究成果展開事業により開発中である。

文 献

- 1) 日本石綿協会：石綿含有建築材料廃棄物量の予測量調査結果報告書(2003) p. 15.
- 2) 環境省アスベストモニタリングマニュアル、第4.0版(2010) pp. 64-72.
- 3) A. Kuroda, T. Nishimura, T. Ishida, R. Hirota and K. Nomura: "Detection of chrysotile asbestos by using a chrysotile-binding protein," *Biotechnol. Bioeng.*, **99** (2008) 285-289.
- 4) T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama and A. Kuroda: "Selective detection of airborne asbestos fibers using protein-based fluorescent probes," *Environ. Sci. Technol.*, **44** (2010) 755-759.
- 5) J. M. Robinson, T. Takizawa, A. Pombo and P. R. Cook: "Correlative fluorescence and electron microscopy on ultrathin cryosections," *J. Histochem. Cytochem.*, **49** (2001) 803-808.
- 6) T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama and A. Kuroda: "Evaluation of sensitivity of fluorescence-based asbestos detection by correlative microscopy," *J. Fluoresc.* (in press.)
- 7) B. T. Mossman, D. W. Kamp and S. A. Weitzman: "Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers," *Cancer Invest.*, **14** (1996) 466-480.

(2011年8月11日受理)